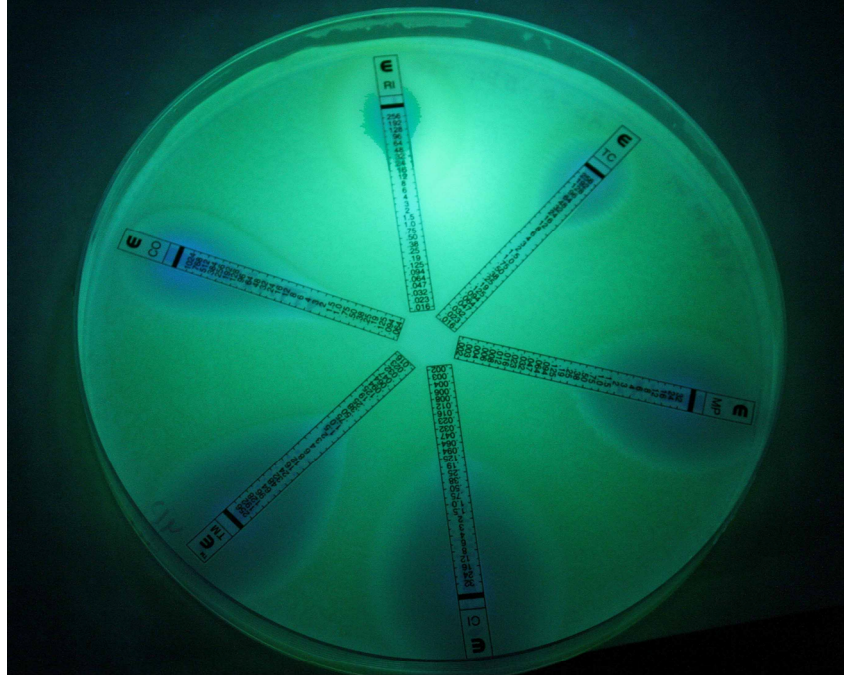


# Kan cytostatikaeksponering føre til antibiotikaresistens hos bakterier?



**Prosjektoppgave, Medisinsk Embetsstudium**

**Stud. Med. Kristin Marie Turcuta**

**Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo**

**09.03.2007**

**Veiledere:**

**Prof. Dr. Med. Petter Brandtzæg, Barnesenteret, Ullevål universitetssykehus, Oslo**

**Cand. Med. Karianne Wiger, Stipendiat, Barnesenteret, UUS, Oslo**

**Seniorforsker, Overlege, Ernst Arne Høiby, Divisjon for smittevern,**

**Folkehelseinstituttet, Oslo**

**Avd. ingeniør May-Liss Knudsen, SMBI, Folkehelseinstituttet, Oslo**

## **ABSTRACT**

### **Does exposure of antineoplastic agents induce antimicrobial resistance in bacteria?**

**Background:** Children with cancer treated with antineoplastic agents are at great risk of suffering from infections during neutropenia. They often receive empiric antimicrobial therapy, and are at risk of acquiring bacteria with antibiotic resistance. There are studies that show an antibacterial effect of antineoplastic agents but we couldn't find the answer to the question: can repeated exposure to antineoplastic agents induce antibiotic resistance in pure cultures of bacteria?

**Material and methods:** We created a very simple trial using the agar-diffusion method to expose five different antineoplastic agents (methotrexate, vincristine, 5-fluorouracil, doxorubicin and cytarabine) at serum concentration levels each to *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) on Mueller-Hinton-agar. The experiment involved 50 overnight growth cycles. All the antineoplastic agents except 5-FU are used in protocols for treatment of childhood cancer, and we used parallel exposure to NaCl as controls. The bacteria were susceptibility tested to 10 different antibacterial agents by Etest® before and after exposure to antineoplastic agents.

**Results:** MIC-values from Etest® before and after exposure of antineoplastic agents for probably more than 10,000 doubling cycles did not differ significantly.

**Conclusion:** Repeated exposure to antineoplastic agents did not lead to reduced susceptibility or resistance against antibacterial agents in *E. coli* or *P. aeruginosa* under our experimental conditions. The conditions (time, complicated ecological situation with many species in close proximity etc.) in natural ecological niches in the normal flora of patients are however very different from our experimental method.

## **BAKGRUNN**

Hva er den direkte cytostatikaeffekten på bakterier? En del bakterier hemmes av noen typer cytostatika in vitro (1-8). Det er også påvist både synergisme og antagonisme for noen cytostatika-antibiotika kombinasjoner in vitro, men det er noe motstridende resultater i litteraturen (9-12). Noe vi imidlertid ikke har klart å finne svar på i litteraturen, er spørsmålet: *Kan eksponering av visse typer cytostatika alene føre til antibiotikaresistens hos bakteriene?* For eksempel, kan vi få en påvirkning på visse bakteriers pumpemekanismer slik at de også får nedsatt følsomhet for noen typer antibiotika?

Ved Ullevål Universitetssykehus i Oslo, Barnesenteret, pågår det nå en klinisk studie av antibiotikaresistens hos barn med kreft. Barn med kreft er en liten, men viktig pasientgruppe. En av de vanligste kreftformer hos barn er akutt leukemi som behandles med cytostatika i store doser. Disse barna får hyppige antibiotikabehandlinger, fordi infeksjon er en fryktet komplikasjon til cytostatikabehandling og nøytropeni. I forbindelse med dette ønsker vi å finne ut om cytostatikabehandling kan bidra til utvikling av antibiotikaresistens hos disse pasientene. Det er ikke tidligere beskrevet studier av bakterier som er utsatt for gjentatt cytostatikaeksponering. Vi ønsket derfor å utvikle en metode for å eksponere bakterien direkte for cytostatika over tid, for så å teste følsomheten til bakterien for antibiotika. For å gjøre dette og for å kunne forstå hva som eventuelt skjer i forsøket, presenteres det først noe bakgrunnskunnskap.

I dag er fem års overlevelse etter behandling av akutt leukemi hos barn på mellom 70 og 90 prosent (13). Den økte overlevelsen skyldes blant annet reduksjonen av kompliserte infeksjoner hos disse pasientene. Det finnes mange forskjellige protokoller for kreftbehandling (14). Ulike krefttyper behandles med ulike cytostatika, men mange av de samme cytostatika går igjen i flere protokoller. Som oftest brukes behandling med flere preparater i kombinasjon. Cytostatika er potente stoffer som dreper kreftceller. Målet med behandlingen er å oppnå selektiv skade på tumor- eller kreftceller, men det terapeutiske vinduet er smalt, og cytostatika virker på alle celler, ikke bare de maligne. De fleste cytostatika virker fortrinnsvis på celler i delingscyklus. De cytostatika vi har valgt å bruke i dette forsøket transporteres inn i humane celler enten ved passive eller aktive mekanismer og virker direkte eller indirekte på DNA eller selve celledelingsprosessen. Se tabell 1 (15-17). Vi

vet lite om hvordan cytostatika transporteres inn i bakterieceller, og tabell 2 viser noen av forskjellene mellom oppbygningen av humane celler og bakterier (35). Bakterier er utstyrt med molekyler med ulik funksjon i cellemembranen, som tillater en aktiv kommunikasjon mellom bakteriens cytoplasma og omgivelsene. Membranmolekylene spiller en rolle i bakteriens forsvar mot påvirkning utenfra.

**Tabell 1: Cytostatikas virkningsmekanismer på humane (eukaryote) celler**

Virkestoff	Type cytostatikum	Virkningsmekanisme
<u>Metotreksat</u>	Antimetabolitt Folatanalog	Binder seg til og hemmer enzymet dihydrofolat reductase (DHR), som omdanner tetrahydrofolat (den aktive folatformen i cellene). Fører til hemmet DNA-syntese og celledød.
<u>Cytarabin</u>	Antimetabolitt Pyrimidinantagonist	Fosforileres intracellulært til aktivt nukleotid, hemmer DNA-syntesen og inkorporeres i og skader DNA.
<u>Fluorouracil</u>	Antimetabolitt Pyrimidinantagonist	Hemmer dannelsen av tymidylat (TMP) som er nødvendig for DNA-syntese. 5-FU-metabolitter inkorporeres i RNA og DNA, som dermed skades.
<u>Vinkristin</u>	Plantealkaloid (Fra <i>Catharanthus roseus</i> )	Binder seg til tubulin og stanser celledelingen.
<u>Doksorubicin</u>	Antracyklin (Cytotoksisk antibiotikum)	Hemmer topoisomerase II og skader DNA. Diffunderer inn i cellen.

**Tabell 2: Karakteristiske trekk ved prokaryoter og eukaryoter**

Cellekomponent	Prokaryoter	Eukaryoter
Nukleus	ingen membran, enkelt sirkulært kromosom, haploid	membran, flere kromosomer haploid-diploid syklus
Ekstrakromosomalt DNA	ofte plasmider	i organeller
Organeller i cytoplasma	ingen	mitokondrier, kloroplaster
Cytoplasmamembran	inneholder respirasjonsenzymer, aktiv sekresjon av enzymer, sete for fosfolipid- og DNA-syntese	semipermeabelt lag, ingen funksjoner som hos prokaryoter
Cellevegg	stivt lag av peptidoglykan	ingen peptidoglykan, hos noen cellulose
Ribosomer	70S i cytoplasma (30S + 50S)	80S i endoplasmatiske retikulum (40S+60S)

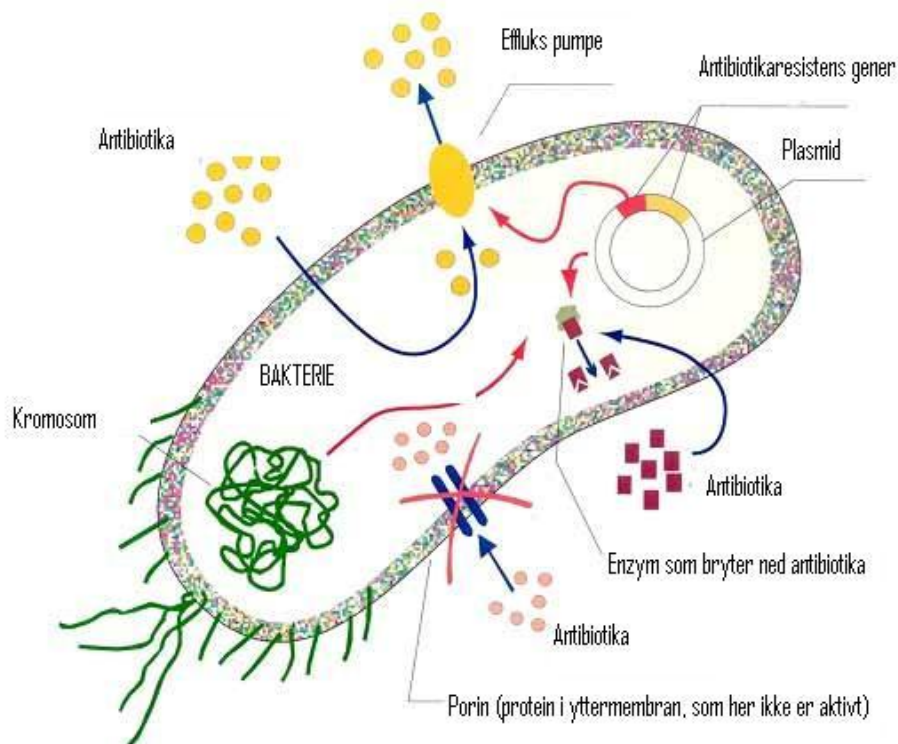
Benmargen har kroppens mest aktive prolifererende vev og er derfor svært utsatt for effekten av cytostatika. Barn som behandles med cytostatika får perioder med nøytropeni som øker faren for alvorlige infeksjoner betydelig. Slike infeksjoner er ofte forårsaket av kroppens egne bakterier. Grampositive bakterier er nå vanligst, men infeksjoner med hurtigvoksende

gramnegative stavbakterier er fortsatt fryktet, for eksempel *Escherichia coli* og *Pseudomonas aeruginosa*. Sepsis forårsaket av gramnegative bakterier har en høy mortalitet og ved febril nøytropeni skal empirisk behandling med bredspektrede antibiotika raskt settes i gang. Rask empirisk behandling redder liv, men massiv bruk av bredspektrede midler kan resultere i antibiotikaresistens. I tilfeller der den sykdomsfremkallende mikroorganismens følsomhet for de ulike antibiotika er kjent, gir dette grunnlag for målrettet terapi med antibiotika. I noen tilfeller påvises bakterier som er resistente mot en eller flere typer antibiotika og terapien må da endres. Antibiotikaproylakse er ikke lenger anbefalt i denne pasientgruppen, hovedsakelig på grunn av faren for utvikling av antibiotikaresistens (18). Antibiotikaresistens er uønsket fordi det øker risikoen for forlenget sykdom og dødsfall ved tilstander som disponerer for infeksjoner - som for eksempel cytostatikabehandling, avansert kirurgi, intensivbehandling og transplantasjoner. Antibiotikaresistente bakterier er som regel ikke mer smittsomme eller virulente enn andre bakterier, men infeksjonene er vanskeligere å behandle (19). Enderesultatet kan være at noen infeksjoner ikke lar seg behandle med de antibiotika som er tilgjengelige i dag og empirisk terapi blir mye vanskeligere.

Det er etter det vi vet ikke tidligere gjort studier på om cytostatika alene kan påvirke bakteriene til å utvikle resistens mot antibiotika, eller bidra til å endre følsomheten overfor antibiotika in vitro. Dersom prøvemateriale fra en pasient som har mottatt både antibiotika og cytostatika (multifarmasi) gir oppvekst av bakterier med antibiotikaresistens, kan man ikke utelukke en effekt av cytostatika på bakterien. Det er derfor behov for å gjøre forsøk som kan se på virkningen av cytostatika alene på bakteriers antibiotikafølsomhet. Tabell 3 gir en oversikt over de viktigste antibiotikas virkningsmekanismer (20). Resistensmekanismer som følge av antibiotikabehandling kan blant annet være endring av målmolekyler i bakteriecellen (PBPer eller på ribosomnivå), enzymatisk modifisering eller ødeleggelse av medikamentet selv, begrenset akkumulering av medikament på grunn av redusert opptak eller aktiv utpumping av antimikrobielle agens (21). En skjematisk framstilling av resistensmekanismene finnes i figur 1. De ulike resistensmekanismene er presentert i detalj i tabell 4 (22).

**Tabell 3: Antibiotikas virkningsmekanismer**

<b>BAKTERICIDE ANTIBIOTIKA</b>	<b>BAKTERIOSTATISKE ANTIBIOTIKA</b>
<b>Påvirker cellevegg/ membran</b>	<b>Hemmer proteinsyntesen</b>
Penicilliner	Azalider ( azithromycin )
Karbapenemer	Fusidin
Cefalosporiner	Linkosamider
Glykopeptider	Kloramfenikol
<b>Hemming på DNA/RNA nivå</b>	Tetracykliner
Rifampicin	Makrolider
Metronidazol	<b>Hemmer folsyresyntesen</b>
Nitrofurantoin	Trimetoprim
<b>Hemmer proteinsyntesen</b>	Sulfonamider
Aminoglykosider	Trimetoprim-sulfa

**Figur 1: Skjematisk tegning av bakteriens oppbygning og resistensmekanismer (EAH)**

**Tabell 4: Resistensmekanismer, antibiotikaresistens hos bakterier**

<b>Type resistens og eksempel på antibiotikaklasse den gjelder</b>	<b>Resistensmekanisme</b>
<b>1. ENDRET MÅLMOLEKYL ( Spratt 1994 )</b>	
Aminoglykosider	Endrer ribosomalt protein
-laktam antibiotika	Endrede, nye eller økt mengde av penicillinbindende proteiner
Erytromycin og klindamycin	Metylering av 23S ribosomalt RNA (rRNA) Skjerming av målmolekyl ved nytt protein
Kinoloner	Endret DNA gyrase
Rifampicin	Endret RNA polymerase ( Caugant et al 1996 )
Sulfonamider	Ny, insensitiv dihydropteroat syntase, økt mengde enzym
Trimetoprim	Ny, insensitiv dihydrofolat reduktase Økt produksjon av målmolekyl ( Spratt 1994 )
Tetracykliner	Ribosomal skjerming
Vankomycin	D-laktat terminus i stammepeptidet i peptidoglykanet
<b>2. ANTIBIOTIKA - INAKTIVERENDE ENZYMER ( Davies 1994 )</b>	
Aminoglykosider	Acetyltransferase, nukleotidtransferase fosfotransferase
-laktam antibiotika	-laktamaser
Kloramfenikol	Acetyltransferase
<b>3. NEDSATT OPPTAK AV ANTIBIOTIKUM HOS MIKROBEN</b> ( Nikaido 1994, Paulsen 1996 )	
<b>a. Nedsatt permeabilitet</b>	
-laktamantibiotika inkl. imipenem, kloramfenikol, kinoloner, tetracykliner, trimetoprim	Bortfall av yttermembranproteiner ( poriner )
<b>b. Aktiv effluks</b>	
Erytromycin Tetracykliner Fluorkinoloner Karbapenemer	Nytt membrantransportsystem i bakteriemembranen

Av tabell 5 ser vi at flere av de antimikrobielle midlene som har et intracellulært målmolekyl er de samme som kan bidra til utvikling av ulike resistensmekanismer (23). Det er grunn til å tro at cytostatika som virker intracellulært på DNA-nivå i humane celler også kan gi mutasjoner i bakteriens DNA/RNA med for eksempel endret målmolekyl og dermed endret følsomhet for antibiotika. En forutsetning er at cytostatika taes opp intracellulært i bakterien. En annen tenkelig prosess er at cytostatikaeksponering endrer bakteriens efflux-pumpesystemer og det selekteres for bakterier som er resistente mot både antibiotika og cytostatika.

**Tabell 5: Intracellulære angrepspunkt**

	Intracellulære angrepspunkt	Ødeleggelse av celleveggen
<b>Cytostatika</b>		
Metotreksat	X	
Vinkristin	X	
Fluorouracil	X	
Doksorubicin	X	
Cytarabin	X	
<b>Antibiotika</b>		
Ceftazidim		X
Cefotaksim		X
Meropenem		X
Ciprofloksacin	X	
Tobramycin	X	
Colistin		X (cellemembran)
Trim-Sulfa	X	
Tetracyklin	X	
Rifampicin	X	

Det er også funnet antibiotikaresistens som følge av andre genetiske endringer hos bakterier i miljøer hvor det skjer en genetisk overføring mellom bakterier. Bakterier med ulikt DNA møtes og det skjer en overføring av genetisk materiale mellom disse. Plasmider eller andre oppkuttete deler av DNA kan overføres ved konjugasjon (24). Se tabell 6.



**Tabell 6: Mekanismer for genetiske endringer hos bakterier**

Mekanisme	Kort beskrivelse av mekanismen	Krever andre mikrober
<b>Transformasjon</b>	Opplukking og integrering av DNA-biter på homolog plass i eget kromosom (homolog rekombinasjon)	x
<b>Mutasjon</b>	Utskifting av basepar fører til endret aminosyre i proteinet	
<b>Konjugasjon</b>	Overføring av DNA (plasmider eller kromosomale DNA-biter) mellom bakterieindivider ved <del>h</del> seksuell+mekanisme	x
<b>Transduksjon</b>	Overføring av gen med bakteriofag (ved <del>+</del> pakkefeil+)	x

Bakteriers følsomhet for antimikrobielle midler kan undersøkes på flere måter in vitro, blant annet med agardiffusjonsmetoden og Etest®-metoden (AB Biodisk, Solna, Sverige). Man bestemmer den enkelte bakteriestammens grad av følsomhet overfor ulike antibakterielle midler. Av rutinemetodene er Etest® den mest nøyaktige ved at man direkte finner bakteriens MIC-verdi, det vil si minste konsentrasjon av et antibiotikum der bakteriestammen ikke vokser (MIC: Minimal inhibitory concentration). For å vurdere den sannsynlige kliniske effekten på bakterien klassifiseres den på grunnlag av MIC-verdien som enten sensitiv (S), intermediær (I) eller resistent (R). Bakterier har fra naturens side bedre følsomhet for noen antimikrobielle midler enn andre, avhengig av bakteriens oppbygning og det antimikrobielle middelets virkningsmekanisme. Det er forskjell i følsomheten på referansestammer av villtypen (betegnes ofte ATCC, NTCC etc. og kommer fra en internasjonal stammebank) og kliniske isolater. Dette er fordi følsomheten for antibiotika kan være avhengig av hvilke agens bakterien har vært utsatt for tidligere. ATCC-stammene har gjerne kjent følsomhet for en rekke antimikrobielle midler. Tabell 7 viser referanseverdier for ATCC stammen av *E. coli* og *P.aeruginosa* for en rekke antibiotika (25).

**Tabell 7: MIC-verdier for ATCC stammer som er brukt i forsøket**

Til kvalitetskontroll, oppgitt som MIC µg/ml

Antibiotikum	Forkortelse	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
		ATCC 25922	ATCC 27853
Cefotaksim	CT	0.032-0.125	4-16
Ceftazidim	TZ	0.064-0.5	0.5-2
Ciprofloksacin	CI	0.004-0.016	0.125-0.5
Colistin	CO	0.125-0.5	1-4
Meropenem	MP	0.008-0.064	0.125-1
Tetracyklin	TC	0.5-2	-
Trimetoprim-sulfa	TS	0.064-0.25	-

### *E. coli*

*E. coli* er en del av normalfloraen i tarm hos mennesker, dyr og fugl. Den kan ikke formere seg frittlevende i naturen. Den kan forårsake sykdom hos mennesker når den produserer toksiner eller befinner seg utenfor tarm. Det finnes en rekke varianter av *E. coli* med ulike virulensfaktorer. Den kan forårsake diaré av ulike typer; i tillegg til urinveisinfeksjoner, meningitt og sepsis (26). Den isoleres hyppig fra sårinfeksjoner, for eksempel abdominale eller gynekologiske sår. I Norge er cirka 85 % av *E.coli*-stammene resistente overfor doxycyklin, cirka 30 % resistente overfor ampicillin, og cirka 15 % resistente for trimetoprim-sulfa (27). Det er påvist forekomst av multiresistens hos *E. coli* flere steder i verden, og bakterien produserer da bl.a. en  $\beta$ -laktamase som er plasmidmediert. I multiresistensbegrepet ligger også resistens mot andre antibiotikagrupper, som for eksempel aminoglykosider og fluorokinoloner.

### *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* er vanligvis ikke patogen for friske mennesker med normale forsvarsmekanismer, på tross av dens mange toksiner. Ved lungesykdommen cystisk fibrose er den en viktig årsak til infeksjon. Den er også å se ved nøytropeni, brannsår, kroniske lungesykdommer og ved respiratorbehandling og den kan gi akutte systemiske, alvorlige infeksjoner. Kolonisering av munn eller tarm hos en pasient med nøytropeni kan gi alvorlig sepsis. Bakterien kan også forårsake, otitis eksterna hos dykkere, follikulitt hos brukere av boblebad og keratitt hos kontaktlinsebrukere. Den gir urinveisinfeksjon etter kolonisering av kateter. Bakteriens evne til å leve i vann og dens motstandsdyktighet mot desinfeksjonsmidler og antibiotika, er ofte bakgrunnen for disse infeksjonene. Ofte er biofilmdannelse involvert. Den er en viktig årsak til nosokomiale infeksjoner.

*P. aeruginosa* er fra naturens side resistent overfor mange antibiotika. Over hele verden kan man i dag finne stammer med multiresistens for  $\beta$ -laktamantibiotika, flurokinoloner og aminoglykosider (28). I klinikken har man derfor begynt å ta i bruk eldre midler som colistin som har vist effekt på infeksjoner forårsaket av *P. aeruginosa*. Kombinasjonsterapi er ofte anbefalt (cefalosporiner eller karbapenem sammen med et aminoglykosid eller colistin). Resistens mot  $\beta$ -laktamantibiotika skyldes effluks-pumpemekanismer og produksjon av  $\beta$ -laktamaser. En annen mekanisme som er kartlagt hos *P. aeruginosa* er impermeabilitet for substanser fordi genet som koder for poriner i celleveggen nedreguleres (29). Dette betyr at et medikament ikke kan trenge igjennom celleveggen hos bakterien. Mekanismene er alle eksempler på konsekvenser av en seleksjon for egenskaper som er gunstige for bakterien i et

fiendtlig miljø, og kan i teorien påvirkes under langvarig cytostatikaeksponering. Tabell 8 og 9 gir en oversikt over bakterienes egenskaper (30).

**Tabell 8: Escherichia coli**

<i>- Gram negativ fakultativt aerob stav</i> <i>- tarmbakterie</i>	
<b>Virulensfaktorer:</b>	Lipopolysakkarid (LPS) Pili og kapsel ( K-antigen ) Flageller ( H-antigen ) Eksotoksiner ( ETEC, EHEC ) Hemolysin
<b>Antibiotikaresistens:</b>	-laktamaser ( Plasmidmediert )

**Tabell 9: Pseudomonas aeruginosa**

<i>- Gram negativ aerob stav</i> <i>- vokser optimalt ved 37 _C</i> <i>- produserer fluorescerende pigment</i>	
<b>Virulensfaktorer:</b>	Lipopolysakkarider (LPS) Pili Lager biofilm Proteaser Andre eksotoksiner Hemolysiner
<b>Antibiotikaresistens:</b>	Permeabilitetsbarriere Multidrug effluxpumper -laktamaser

## MATERIALE OG METODE

Effekten på bakterier av følgende cytostatika ble studert: Metotreksat (MTX), vinkristin (VIN), 5-fluorouracil (5-FU), cytarabin (CYT) og doksorubicin (DOX), se tabell 10.

### Forberedelser

Cytostatika ble levert i pulverform eller injeksjonsvæske fra Ullevål sykehusapotek i Oslo. Vi blandet ut cytostatika i sterilt saltvann til løsninger med ønsket konsentrasjon. Dette ble gjort i to omganger, og løsningene ble fryst ned. Nødvendige forhåndsregler ved håndtering av cytostatika ble fulgt (31). Ved gjennomgang av litteraturen har vi forsøkt å lage en oversikt over cytostatikas egenskaper for best å lage et forsøk som bl.a. tar hensyn til lysømfintlighet, minimums- og maksimumskonsentrasjoner i serum, pH, nedfrysing, holdbarhet og lipofilitet (32, 33). Se tabell 11. Frysetørrede bakteriestammer av *E. coli* (ATCC 25922) og *P. aeruginosa* (ATCC 27583) ble tatt opp fra fryser, sådd ut på laktoseagar og inkubert over natten. Dette er bakterier som er lette å jobbe med fordi de deler seg raskt og vokser godt på agarskål i løpet av 24 t.

**Tabell 10: Cytostatika brukt til in vitro-eksponering av bakterier**

Virkestoff	Produktnavn	Produsent	Kons, mengde	Fortynning	Konsentrasjon
Metotreksat (MTX)	Emthexat®	Wyeth AB	5 mg/ml, 3ml	NaCl 0,9%	150 µg/ml*
Vinkristin (VIN)	Vincristine M®	Mayne	1 mg/ml, 2ml	NaCl 0,9%	0,5 µg/ml
5-Fluorouracil (5FU)	Fluorouracil Mayne®	Mayne	50 mg/ml, 10ml	NaCl 0,9%	50 µg/ml*
Doksorubicin (DOX)	Doxorubicin®	Pfizer	100 mg, pulver	NaCl 0,9%	15 µg/ml
Cytarabin (CYT)	Cytosar®	Nycomed Pharma	10mg, pulver	NaCl 0,9%	50 µg/ml

\*I tillegg ble det laget løsninger med MTX: 500 µg/ml og 5FU: 250 µg/ml.

**Tabell 11: Cytostatika: egenskaper**

	Lysømfintlighet	Temperatur min/max	pH <sup>1</sup>	Frysing	Holdbarhet <sup>2</sup>	Lipofilt <sup>3</sup>
Metotreksat	Ja	/ 25 _C	7,5 - 9,0	20 _C -		Noe
Vinkristin	Ja	2-8 _C / 25 _C	3,5 - 5,5	Ingen data	24t	Lite
Fluoruracil	Ja	2-8 _C / 25 _C	8,6 - 9,0	20 _C -	< 24t	Ja
Doksorubicin	Ja		3,8 - 6,5*	20 _C -	24t	Ingen data
Cytarabin	Ja	/ 25 _C	ca 5,0	Ingen data	12 - 24t	Lite

\* For tørrstoff løst i NaCl, <sup>1</sup>pH intervall for best stabilitet, <sup>2</sup>Holdbarheten er gitt for åpent emballasje i romtemperatur, <sup>3</sup>Om stoffene er lipofile eller ikke er det blandete data på, men ettersom de alle lar seg løse i NaCl, er de per definisjon i utgangspunktet noe hydrofile.

### ATCC-stammenes følsomhet for antibiotika, Etest®

Bakteriene ble følsomhetstestet med Etest® ved starten av forsøket, etter standardmetode beskrevet i Etest® technical manual (34). Hver ATCC-stamme ble testet i to paralleller ved forsøkets start; I og II. Hvilke antibiotika som er testet fremgår av senere tabeller. MIC-verdiene brukes som sammenlikningsgrunnlag for bakterienes følsomhet etter eksponering av cytostatika, og det er denne bakterien som betegnes som kontrollstamme gjennom resten av forsøket.

### Gjennomføring av hovedforsøket

Vi laget følgende hypotese for forsøket:

*Gjentatt in vitro-eksponering for cytostatika tilsvarende serumkonsentrasjoner som oppnås ved cytostatikabehandling kan føre til antibiotikaresistens eller nedsatt følsomhet for antibiotika hos bakterier.*

Forsøkene ble gjennomført ved Folkehelseinstituttet i Oslo, avdeling SMBI, og gikk over 50 døgn med bakterier eksponert for standardisert mengde cytostatika ved agardiffusjonsmetoden (20, 35). Parallellt med forsøket er det brukt kontroller med NaCl 0,9 %. Forsøket er beskrevet med tekst og figurer i figur 1: Flytskjema Laboratorieforsøk; Gjentatt cytostatikaeksponering overfor bakterier. Veiledere, laboratoriepersonale og student har vært med på gjennomføringen våren 2006. Agarskålene med cytostatika og bakterie ble lest av dag 1 ó 50 og resultatene ført inn i avlesningsskjemaer. Diameter på hemningssonen og eventuelle andre forandringer rundt sonen ble registrert. Dag 0 betegner dagen for Etest® av kontrollstammen før første applikasjon av cytostatika. Dag 1 er første dag med avlesning av agar-skål etter eksponering av cytostatika.

### Ekstraforsøk

Vi gjennomførte et ekstraforsøk med sterkere konsentrasjoner av MTX (500 µg/ml) og 5-FU (250 µg/ml) i 36 dager, under hypotesen: *Gjentatt eksponering av cytostatika i større doser enn vanlig oppnådde serumkonsentrasjon kan gi antibiotikaresistens eller nedsatt følsomhet for antibiotika.* Forsøket gikk parallelt med ordinærforsøket.

### Bakterienes følsomhet for antibiotika etter cytostatikaeksponering, E-test®

Da forsøket med cytostatikaeksponering var ferdig, ble kontrollstammene og bakteriene fra dag 50 og dag 36 fra ekstraforsøket sådd ut med rotator på Mueller-Hinton (MH) -agar, og vi utførte Etest® med de samme antibiotika som før forsøket. MIC-verdiene ble lest av og ført

inn i skjema av to personer uavhengig av hverandre. Noen av agarskålene med inhibisjonssoner ble fotografert. I inhibisjonssonen til Etest® for meropenem og cefotaksim, observerte vi kolonier av bakterier som vi heretter kaller subkolonier. Subkoloniene ble også spredd på MH-agar og følsomhetstestet på samme måte under hypotesen: *Bakteriene i koloniene inne i meropenem- og cefotaksimssonen, utgjør en subpopulasjon som har et forsvar mot disse typene antibiotika og dermed har høyere MIC-verdier enn resten av bakteriene i stammen.*

Figur 1:

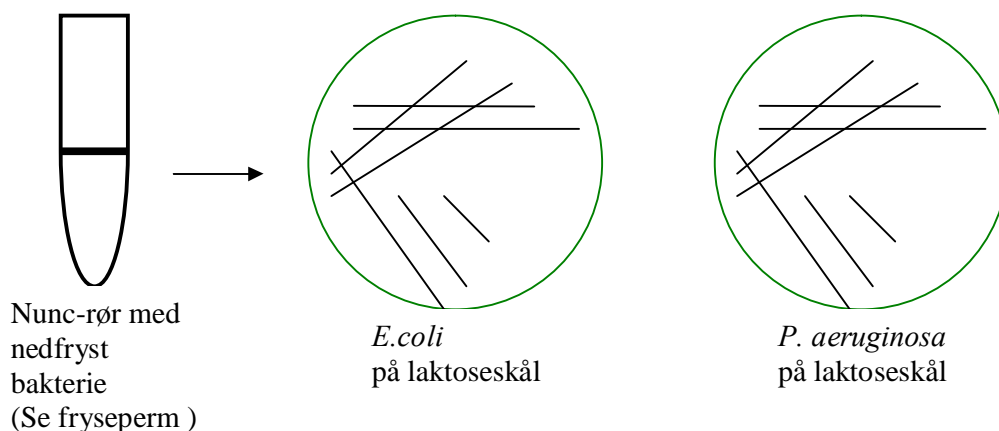
**FLYTSKJEMA**  
**Labratorieforsøk: Cytostatika versus bakterier**

**Utstyrliste:**

- Nunc-rør med nedfryst bakterie, kontrollstamme ATCC
- Nunc-rør med nedfryst cytostatikaløsning
- Agarskåler med Mueller Hinton medium
- WR reagensrør, uten innhold
- WR reagensrør med NaCl 0,9%
- Reagensrør med Greavesøfrysemedium (glyserol holdig)
- Plastøser, store og små
- Vattpinner
- Plastpipette
- DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan
- Retro C80 Rotator
- Filterpapirlapper, sterile, BBL
- Luftavtrekksbenk
- Micropipette 100µl
- Hansker, munnbind og frakk for håndtering av cytostatika

**DAG -1 (16.01.06)**

**Bakteriene *E.coli* og *P.aeruginosa* tas opp fra fryser og sås ut på hver sin laktoseskål. Inkuberes over natten ved 35°C.**



**DAG 0 (17.01.06) Utsæd av bakterier og applikasjon av cytostatika****SIKKERHETSROUTINER**

- Jobb i LaminaryAirFlow
- Bruk doble hansker ( latex ytterst ), frakk, munnbind
- Avfallshåndtering: som annet risikoavfall - kastes i egen beholder
- Skjerme for sterkt lys

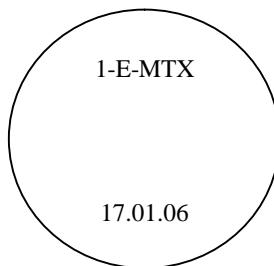
**1) Merking av skål:****Merking av Mueller-Hinton agar:**

1, 2 etc = dag

E = *E. coli*P = *P. aeruginosa*

Cytostatikaforkortelser (se under)

Dato

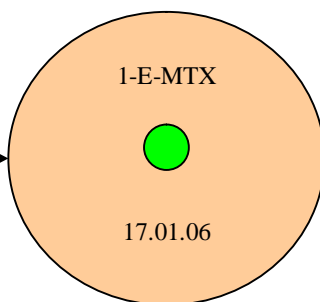
**2) Utsæd av bakterier:**

Høst bakterien fra laktoseagar, lag 0,5 Mc Farland (MF) ved oppslemming i 0,9% NaCl. Bruk densitometer. Bakterieløsningen strykes utover ved hjelp av rotator på Mueller Hinton (MH) agar og merkes.

**3) Applikasjon av cytostatika:**

**Nunc-rør med cytostatika, fra fryser**

MTX - Metotreksat  
 VIN - Vinkristin  
 5-FU - Fluoruracil  
 DOX - Doksorubicin  
 CYT - Cytarabin  
 NaCl - Kontroll



Mueller-Hinton-agar med cytostatikalapp og bakterie

**3a)** Ta opp Nunc-rørene fra fryseren. Tines på benk.

**3b)** Legg **lappen** på MH-agar med utsed av bakterie. Bruk Eppendorf pipette og overfør 15µl cytostatika fra **Nunc-rør** til filterpapirlapp.

**3c)** Inkuber MH-agar 18-24t ved 35°C i fuktammer



**DAG 1 (18.01.06) – DAG 50, Utsed av bakterier, applikasjon og nedfrysing <sup>6)</sup>****Lage bakteriesuspensjon**

**1) Brenn av WR rør A og Greaves-rør B og merk alle rør**

**2) Overfør 0,5 ml Greaves fra rør B til rør A med plastpipette**

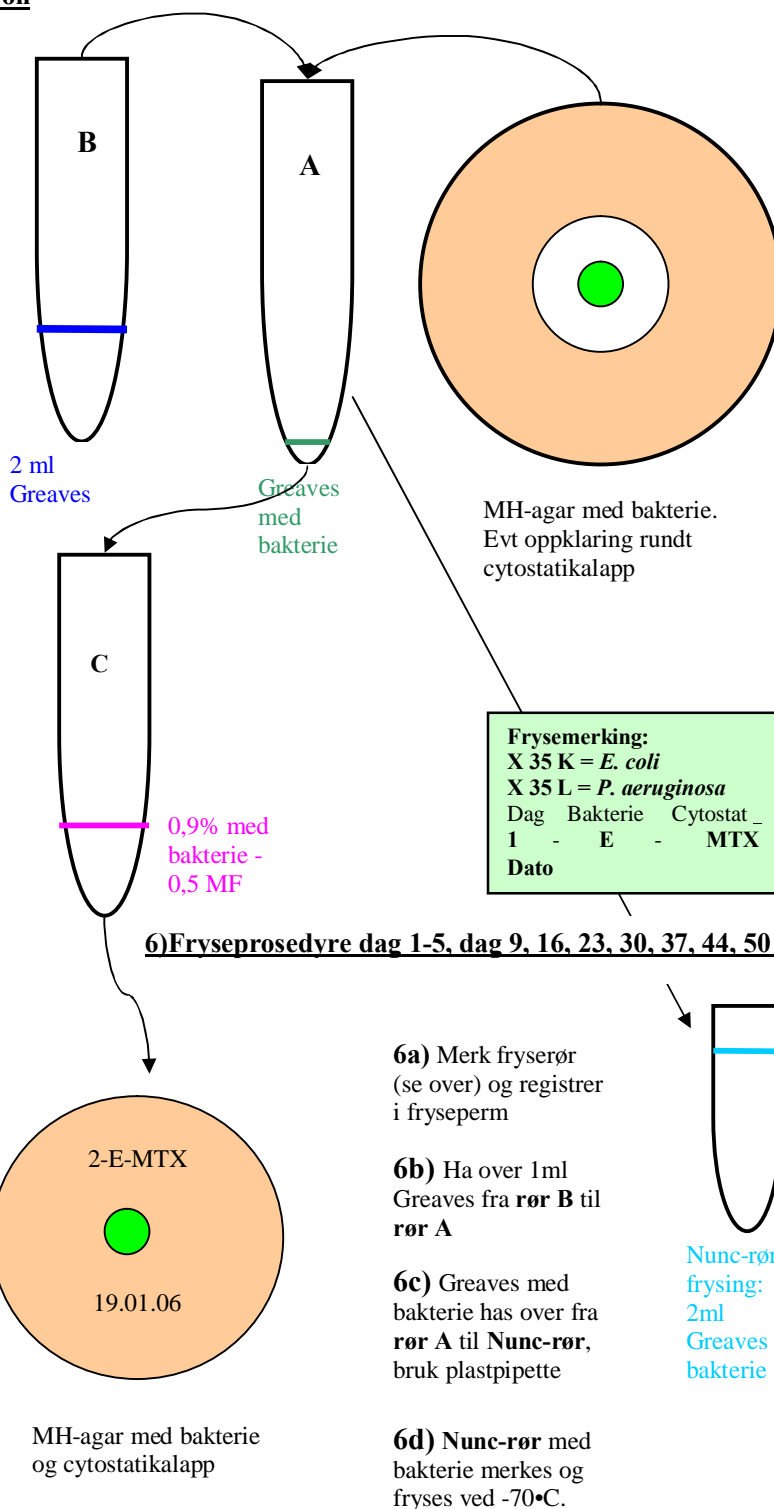
**3) Bruk vattpinne og samle bakterier fra hele randsonen. Dersom det ikke er noen sone, fjern lappen og ta bakterier inntil lappesonen. Has oppi rør A.**

**4) Bruk vattpinne og overfør bakteriesuspensjon fra rør A til rør C som inneholder NaCl. Titrér fram til 0,5 MF. ( bruk densitometer ). Spres på MH-agar med rotator**

**5) Applikasjon av cytostatika;**

Som pkt 3) dag 0

Inkuberes 18-24 t ved 35°C i fuktammer



## RESULTATER

### Kontrollstammer

MIC-verdiene ved Etest® av kontrollstammene var sammenliknbare med referanseverdiene oppgitt for ATCC-stammer både hos *E. coli* og *P. aeruginosa* (29). Ved avlesning av MIC-verdiene for *P. aeruginosa* ble kolonier i inhibisjonssonene til meropenem, cefotaksim og ceftazidim registrert. MIC-verdier for kontrollstammene er presentert i tabell 12.

**Tabell 12: MIC-verdier for kontrollstammer**

*E. coli* (ATCC 25922) og *P. aeruginosa* (ATCC 27853) før nedfrysing:

	Antibiotikum	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>P. aerug.</i>
	Etest:	referanse	I*	II*	referanse	I	II
<b>TZ</b>	Ceftazidim	0,064-0,5	0,125	0,125	0,5-2	1	1 m/ koloni
<b>CT</b>	Cefotaksim	0,032-0,125	0,023	0,023	4-16	8 m/ kolonier	8 m/ kolonier
<b>MP</b>	Meropenem	0,008-0,064	0,016	0,016	0,125-1	0,38 m/ kolonier	0,25 m/ kolonier
<b>CI</b>	Ciproksin	0,004-0,016	0,006	0,006	0,125-0,5	0,19	0,19
<b>NA</b>	Nalidiksin		3	3		192	64
<b>TM</b>	Tobramycin		1	0,75		0,38	0,38
<b>CO</b>	Colistin	0,125-0,5	0,125	0,125	1-4	1	1
<b>TS</b>	Trim-sulfa	0,064-0,25	0,064	0,064	res (>4)	32	32
<b>TC</b>	Tetracyklin	0,5-2	2	2	Res (>=16)	16	16
<b>RI</b>	Rifampicin		8	8		32	32

\*I og II tilsvarer parallell I og II.

### Hovedforsøk med cytostatika

#### *E. coli*

Ingen av agarskålene med *E. coli* dag 1-50 hadde inhibisjonsone rundt cytostatikalappen. Det var heller ingen inhibisjonszoner i forsøket med høyere konsentrasjon av metotrexat og fluorouracil. Det var altså ikke makroskopisk synlig baktericid eller bakteriostatisk effekt av cytostatika på *E. coli* i dette forsøket. Vår hypotese var at langvarig cytostatikaeksposering kan påvirke bakterienes følsomhet overfor antibiotika. Tabell 13 viser MIC-verdier for *E. coli* etter cytostatikaeksposering i 50 og 36 dager sammenliknet med MIC-verdier for

kontrollstammene. *E. coli* som har vært eksponert for NaCl i 50 dager parallelt med forsøket som kontroll ble også testet med Etest®. Resultatene er presentert i tabell 13.

### *P. aeruginosa*

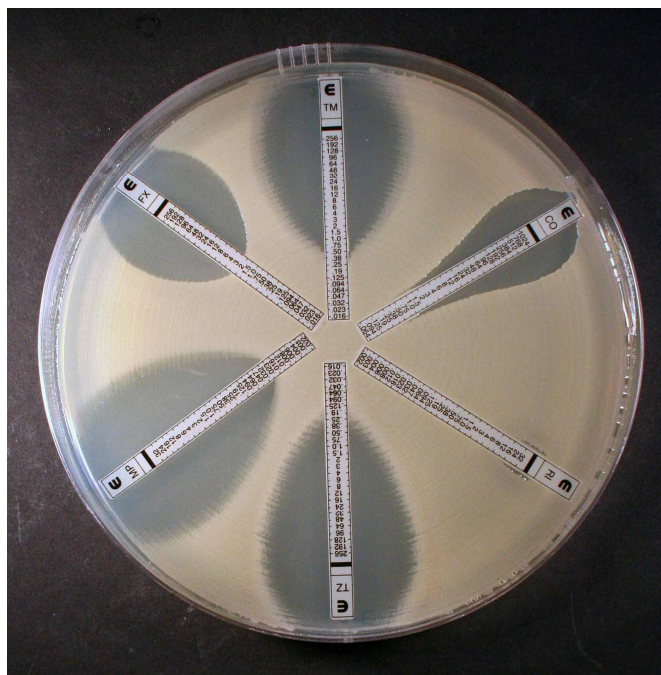
Når denne bakterien vokser på Mueller-Hinton agar er den lysegrønn. Gjennom forsøket med *P. aeruginosa* og cytostatikaeksponering over 50 dager, ble det registrert noen forandringer på agarskålene. Det ble tidlig observert at det vokste bakteriofag på agarskålene. Bakteriofager er virus som ødelegger bakterier. Bakteriofagene infiserer bakteriecellen, og når bakteriecellene lyseres dannes det et synlig plakk på agarskålen (36).

Laboratoriepersonale ved folkehelseinstituttet gjenkjente dette på agarskålene med *P. aeruginosa*. På skålene med 5-FU ble det registrert bakterieinhibisjon av *P. aeruginosa* dag 1, 2, 4 og 17, med lavere tetthet av bakterier rundt cytostatikalappen. Det samme ble registrert på skålene med 5-FU 250 µg/ml, dag 3-6. MIC-verdiene ved Etest® av *P. aeruginosa* viser resistens mot cefoxitin, trimetoprim og tetracyklin, både hos kontrollstammene og etter cytostatikaeksponering dag 50/36. Ved Etest® med meropenem, cefotaksim og ceftazidim ble det registrert kolonier inne i inhibisjonssonene, noe vi også registrerte ved Etest® av kontrollbakterien. Resultatene er presentert i Tabell 14.

**Tabell 13: MIC-verdier, *E. Coli***MIC-verdier for *E. coli*-kontroller og etter cytostatikaeksponering dag 50/36.

Frysenr.	ID	Tetracyklin	Meropenem	Ciproksin	Tobramycin	Colistin	Rifampicin	Nalidixsin	Ceftazidim	Trimeto-prim
		TC	MP	CI	TM	CO	RI	NA	TZ	TR
Referanse	ATCC 25922	0,5-2	0,008-0,064	0,004-0,016		0,125-0,5			0,064-0,5	0,064-0,25
X35K01	0-E-KTR I	1,5	0,023	0,012	0,5	0,5	24	2	0,5	0,75
X35K68	50-E-MTX	1	0,023	0,012	0,38	0,5	32	2	0,5	0,75
X35K69	50-E-VIN	1	0,023	0,012	0,5	0,5	32	2	0,5	1,0
X35K70	50-E-5FU	1	0,023	0,012	0,38	0,75	24	1,5	0,5	1,0
X35K71	50-E-DOX	1	0,023	0,012	0,38	0,5	24	2	0,5	0,75
X35K72	50-E-CYT	1	0,032	0,012	0,25	0,38	32	2	0,5	0,75
X35K73	50-E-NaCl	1	0,023	0,012	0,38	0,38	16	2	0,38	0,75
X35M67	36-E-MTX500	1	0,032	0,012	0,38	0,5	16	2	0,5	0,75
X35M68	36-E-5FU250	1	0,023	0,012	0,38	0,5	12	2	0,5	0,75
X35M69	59-E-NaCl	1,5	0,023	0,012	0,38	0,38	12	3	0,38	0,5

Kommentar, tabell 12: Tabellen viser at MIC-verdiene for *E. coli* før og etter eksponering av cytostatika i 50/36 dager er tilnærmet lik og innenfor referanseområdene for ATCC-stammer, oppgitt av AB Biodisk.



**Bilde 1** viser Etest av *E. coli*, kontrollstammen (0-E-KtrI), testet overfor cefotaksim (FX), tobramycin (TM), colistin (CO), rifampicin (RI), ceftazidim (TZ) og meropenem (MP). (Foto: E.A. Høiby)

**Tabell 14: MIC- verdier, *P. aeruginosa*****MIC-verdier for *P.aeruginosa*-kontroller og etter cytostatikaeksposering dag 50/36.**

Frysenr.	ID	Meropenem	Ciproksin	Tobramycin	Colistin	Rifampicin	Cefotaksim	Ceftazidim
		MP	CI	TM	CO	RI	CT	TZ
<b>Referanse</b>	ATCC 27853	0,125-1	0,125-0,5		1-4		4-16	0,5-2
X35L01	0-P-ktrl	0,38 m/ kolonier	0,25	0,5	1,5	>32	8 m/ koloni	1,5
<b>X35L68</b>	50-P-MTX	0,5	0,38	0,75	0,75	>32	12	1,5
<b>X35L69</b>	50-P-VIN	0,38	0,25	0,5	0,75	>32	12	1,5
<b>X35L70</b>	50-P-5FU	0,5 m/ kolonier	0,38	0,38	0,75	>32	12 m/ kolonier	2
<b>X35L71</b>	50-P-DOX	0,5 m/ kolonier	0,25	0,38	0,75	>32	12 m/ kolonier	2
<b>X35L72</b>	50-P-CYT	0,5	0,25	0,5	0,75	>32	16	2
<b>X35L73</b>	50-P-NaCl	0,5	0,38	0,38	1	>32	12	2
<b>X35M70</b>	36-P-MTX500	0,38	0,25	0,5	1	>32	12	2
<b>X35M71</b>	36-P-5FU250	0,38	0,25	1	1	>32	12 m/ kolonier	1,5 m/ kolonier
<b>X35M72</b>	59-P-NaCl	0,38	0,25	1	0,75	>32	12	2

*Kommentar tabell 14: MIC-verdiene hos P. aeruginosa i dette forsøket ligger innenfor referanseområdene til ATCC-stammen (AB Biodisk). Vi finner kolonier med bakterier som vokser inne i inhibisjonssonene til meropenem (MP), cefotaksim (CT) og ceftazidim (TZ), etter eksponering for 5-FU 50 µg/ml og 250 µg/ml og DOX 15 µg/ml. Etest® av kontrollstammene og de bakteriene der en fant kolonier ble gjort om igjen, med samme resultater.*



**Bilde 2** viser Etest av *P. aeruginosa* etter cytostatikaeksponering (36-P-5FU250) testet overfor rifampicin (RI), tetracyklin (TC), meropenem (MP), ciproksin (CI), tobramycin (TM) og colistin (CO). *P. aeruginosa* er grønn når den vokser på MH-agar. Vi ser bakteriofag som vokser sammen med bakterien. Det ses kolonier inne i inhibisjonssonen til MP. Bakteriofagen vokser ikke i en sone rundt RI. (Foto: E.A Høyby)

#### Funn av kolonier i inhibisjonssonene

For å undersøke betydningen av koloniene som vokste inne i inhibisjonssonene, testet vi følsomheten til disse bakteriene. Vi høstet kolonier fra inhibisjonssonene til meropenem og cefotaksim fra kontrollstammene og *P. aeruginosa* utsatt for 5-FU i 50 og 36 dager (0-P-Ktr I, 50-P-5FU og 36-P-5FU250), under hypotesen: Det er en subpopulasjon av *P. aeruginosa* (ATCC 27853) som er delvis resistent mot meropenem og cefotaksim, og bakteriene i koloniene har høyere MIC-verdier overfor disse antibiotika. Resultatene er presentert i tabell 15. Se også bilde 3 og 4.

#### Ekstraforsøk med cytostatika:

Underveis i ordinærforsøket ble det bestemt å starte en ny serie med cytostatikaeksponering i høyere konsentrasjoner. Det var ingen makroskopisk baktericid eller bakteriostatisk effekt av MTX 500 µg/ml eller 5-FU 250 µg/ml. Etestingen av bakteriene i dette forsøket viste ingen signifikant endret følsomhet overfor antibiotika, men kolonier i inhibisjonssonene ble også funnet her. Se tabell 12 og 13.

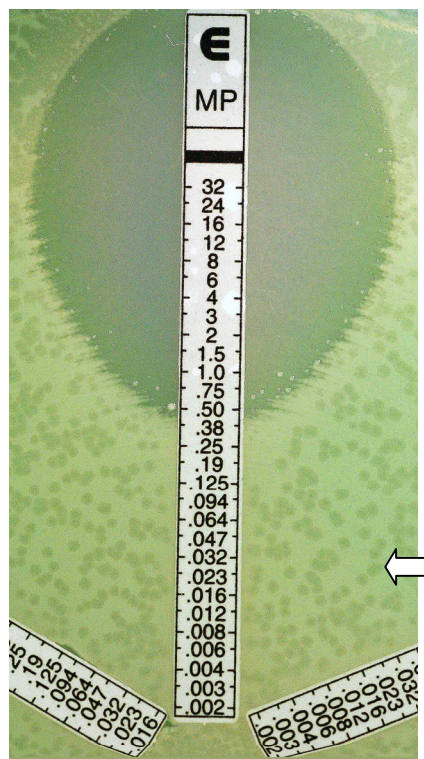
**Tabell 15: MIC-verdier *P. aeruginosa* kolonier fra inhibisjonssoner****Etest® *P. aeruginosa*, testing av kolonier**

Frysenr.	ID	Koloni fra	Meropenem	Ciproksin	Tobramycin	Colistin	Rifampicin	Cefotaksim	Ceftazidim
			MP	CI	TM	CO	RI	CT	TZ
<b>Referanse</b>	ATCC 27853		0,125-1	0,125-0,5		1-4		4-16	0,5-2
X35L01	0-P-ktrl		0,38	0,38	0,75	1	32	12	1,5
X35M73	36-P-5FU250	MP	0,75	0,25	0,75	0,75	48	32	2
X35M74	36-P-5FU250	CT	0,75	0,25	1	0,75	32	256	24
X35M75	50-P-5FU	MP	1	0,38	1	0,75	64	48	6
X35M76	50-P-5FU	CT	1	0,38	1	0,5	48	192	4

**Etest® *P. aeruginosa*, testing av kolonier hos kontroll**

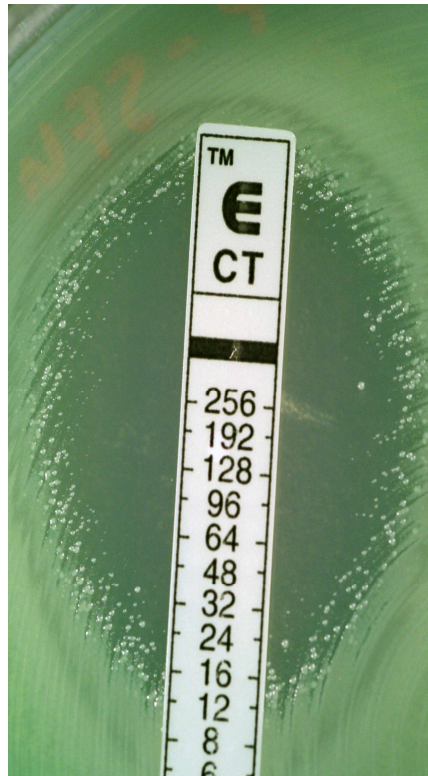
Frysenr.	ID	Koloni fra	Meropenem	Ciproksin	Tobramycin	Colistin	Rifampicin	Cefotaksim	Ceftazidim
			MP	CI	TM	CO	RI	CT	TZ
X35M77	0-P-Ktr I	MP	0,75	0,5	0,75	1	32	48	3
X35M78	0-P-Ktr I	CT	0,5	0,25	0,75	0,75	32	256	1
X35M79	50-P-NaCl	MP	2	0,38	0,75	0,75	32	128	4
X35M80	50-P-NaCl	CT	1,5	0,5	0,75	0,5	32	256	16

Kommentar tabell 15: Subkoloniene i MP- og CT- inhibisjonssonene hos kontrollbakteriene viser signifikant høyere MIC-verdier overfor antibiotikaene meropenem, cefotaksim og ceftazidim.



**Bilde 3** viser Etest® av *P. aeruginosa* etter cytostatikaeksposering (50-P-5FU) overfor MP, med kolonier som vokser inne i inhibisjonssonen. Bakteriofag ses som øplakkø sammen med *P. aeruginosa* (pil). (Foto: E.A. Høiby)





**Bilde 4** viser Etest av *P. aeruginosa* etter cytostatikaeksponering (50-P-5FU) testet overfor cefotaksim (CT). Her ser vi en forhøyet MIC-verdi sammenliknet med kontrollstammen og rikelig med kolonier som vokser i inhibisjonssonen. Her ses ikke vekst av bakteriofag. (Foto: E.A. Høiby)



## **DISKUSJON**

Barn med kreft mottar behandling med både cytostatika og antibiotika. Det er tidligere funnet antibakteriell effekt hos noen typer cytostatika. Vi har gjennomført et forsøk som for å undersøke om gjentatt cytostatikaeksponering direkte på bakterier kan bidra til nedsatt følsomhet eller resistens mot antibiotika.

### Valg av metode

Vårt forsøk er et in vitro-forsøk der man i en kunstig situasjon undersøker direkte virkning av cytostatika på en enkelt bakteriestamme i renkultur. Dette er en situasjon svært langt fra virkeligheten. Utenfor laboratoriet lever bakterier i ulike miljøer i komplekse samspill med andre mikroorganismer. De påvirkes av antibiotikabehandling, desinfeksjonsmidler, immunforsvar og andre kjemiske midler. De spres via mennesker, instrumenter, dyr og faktorer i omgivelsene som vann, jord og mat. Vi har her valgt et rent, forenklet forsøk for å se om renkulturer av to standardstammer hver for seg etter langvarig påvirkning av cytostatika får endret antibiotikafølsomhet (tabell 16, linje 1). Det er mulig at et forsøk konstruert på en annen måte kunne gitt andre resultater.

**Tabell 16: Ulike forsøksmodeller**

Bakterie i	Påvirkning på bakteriestammen:		Følsomhetstestet mot
	Cytostatika	Antibiotika	
Renkultur (vårt forsøk)	+	-	Antibiotika v/ Etest
Renkultur	-	+	Antibiotika v/ Etest
Renkultur	+	+	Antibiotika v/ Etest
Sammensatt populasjon	+	-	Antibiotika v/ Etest
Sammensatt populasjon	-	+	Antibiotika v/ Etest
Sammensatt populasjon	+	+	Antibiotika v/ Etest

Ved langvarig eksponering av antibiotika følger man i prinsippet et forsøk som i linje to. Et forsøk satt opp som i linje tre ville gitt oss en studie av samspillet mellom antibiotika og cytostatika i påvirkning av bakterien. Det er tidligere vist at disse kan ha både en synergistisk eller antagonistisk effekt på hverandre, og dermed på bakterien (9-12). Forsøk med cytostatikapåvirkning av flere bakterier samtidig, ville kunne åpne for at det skjer utveksling

av genetisk materiale, som vist i tabell 5. Det er mulig å gjennomføre alle disse studiene ved hjelp av den metoden vi har brukt i dette forsøket.

### Medium

Vi har valgt å bruke Mueller-Hinton (MH)-agar i forsøket med agardiffusjon og ved bruk av Etest®. Både ved agardiffusjon og Etest er prinsippet at et stoff (antibiotika eller cytostatika) diffunderer i en gradient utover agaren, slik at bakterien som vokser der påvirkes i ulik grad. MH-agar er det best standardiserte faste medium til bruk for følsomhetstesting av patogener (37). Agaren er kvalitetskontrollert for bruk på *E. coli* og *P. aeruginosa*. Den er også lett å jobbe med. I en minireview konkluderes det med at bakterier dyrket på fast medium likner morfologisk mer på de man finner in vivo, og fast medium er derfor mer egnet til å undersøke forhold som skal likne de faktiske forhold in vivo (38). I vårt forsøk kunne vi alternativt ha brukt et flytende medium som MH-buljong for å eksponere bakteriene for cytostatika, hvor det er mulig at bakteriene hadde fått en annerledes funksjon, morfologi eller veksthastighet og dermed en annen følsomhet for antibiotika. Det er også mulig at eksponeringen av cytostatika overfor bakterien ville vært jevnere i et flytende medium hvor man ikke er avhengig av diffusjon som genererer gradienter. Men nettopp en gradient av cytostatika som sikrer eksponering av bakterien for ulike konsentrasjoner var etter vår mening en fordel.

### Cytostatikavalg

Det er funnet baktericid eller bakteriostatisk effekt på gramnegative bakterier utsatt for MTX, CYT og 5-FU (5, 39, 40). Antibakteriell effekt av MTX, DOX og 5-FU er sett hos grampositive bakterier (2, 3, 6, 40). Det er imidlertid motstridende resultater i litteraturen, og i studiene der det er funnet samme antimikrobielle effekt av cytostatika er det brukt forskjellige metoder. Vi fant ikke noen referanser med antibakteriell effekt av VIN. De cytostatika som er brukt i vårt forsøk ble valgt fordi de har vist antibakteriell effekt, har klinisk relevans eller fordi de var tilgjengelige og hadde egenskaper som passet med utformingen av forsøket. Bortsett fra 5-FU benyttes alle i protokoller for barn med kreft. 5-FU brukes i behandling av solide tumorer hos voksne. Vi brukte 5-FU i forsøket fordi det er flere studier som viser at stoffet har antibakteriell effekt. Det finnes studier som viser antibakteriell effekt av andre cytostatika på både grampositive og gramnegative bakterier, og det bør gjennomføres forsøk også med disse cytostatika.

### Cytostatikakonsentrasjoner

Vi ønsket å eksponere bakteriene for cytostatika tilsvarende serumkonsentrasjonsnivå for eventuelt å kunne relatere resultatene til en klinisk sammenheng. Vi tok utgangspunkt i dosering brukt i protokoller for cytostatikabehandling og ville bruke  $T_{1/2}$ , kunnskaper om farmakokinetikk og farmakodynamikk, samt metabolisme og eliminasjonsmåte for å beregne topp- og bunnkonsentrasjoner in vivo. Det viste seg å være vanskelig å beregne dette, ikke minst fordi dosering i protokollene er oppgitt i  $\text{mg}/\text{m}^2$  og toppkonsentrasjonene i plasma oppgis i  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Konsentrasjonene i dette forsøket er derfor basert på oppgitte serumkonsentrasjoner etter cytostatikabehandling i litteraturen (12) eller konsentrasjoner som er brukt i andre in vitro forsøk (41-44). Underveis i forsøket valgte vi allikevel å starte et ekstrarforsøk med mye høyere konsentrasjoner av MTX og 5FU, for å teste muligheten for at cytostatika lettere påvirker bakterien i større konsentrasjoner.

### Cytostatikas egenskaper

I tabell 11 har vi presentert de cytostatikaegenskaper vi har tatt hensyn til i forsøket. Alle de brukte cytostatika er lysømfintlige, og løsningene ble så langt det var mulig oppbevart i mørket etter fortynningen. Det er manglende data på om VIN og CYT kan fryses, og henvendelse til produsenten besvarte ikke dette spørsmålet. Vi valgte allikevel å fryse alle cytostatikaløsningene da dette var avgjørende for praktisk gjennomføring av forsøket. En mulig feilkilde er at om VIN og CYT ikke tåler nedfrysing, kan virkestoffet i løsningene etter nedfrysning være inaktivt. MH-agaren er vannbasert og en forutsetning for diffusjon av cytostatika utover på agarskålen er vannløselighet. Vi har ikke spesifiserte opplysninger om cytostatikaenes vannløselighet utover at de alle lar seg løse i NaCl 0,9 %. Dersom cytostatikaløsningen vi dryppet på lappene ikke skulle diffundere utover ville vi allikevel se en eventuell bakteriehemning inntil lappen. Alle agarskålene ble inkubert i fuktekammer, noe som begrenser fordampningen av cytostatika fra papirlappen slik at virkningen varer lengst mulig. I tabell 11 er pH-intervall for best stabilitet av cytostatika angitt. Vi tolker dette til at blandinger som skal fortynne eller brukes til oppbevaring bør ha denne pH-verdien. pH på MH-agar skal være  $7,4 \pm 0,2$  ved  $37^\circ\text{C}$  (45). En ser av tabellen at de fleste intervallene for best stabilitet faller utenfor, men det er ingen grunn til å tro at cytostatikaene ødelegges ved å komme i kontakt med agaren.

### Bakterievalg

Det er tidligere gitt utfyllende informasjon om bakteriene brukt i dette forsøket og deres egenskaper, samt mekanismer for antibiotikaresistens. I litteraturen er det flere resultater med antibakteriell effekt av cytostatika på grampositive bakterier enn på gramnegative. Infeksjoner med grampositive bakterier er i dag hyppigere forekommende hos barnekreftpasienter enn gramnegative. For å utvikle en metode for å eksponere cytostatika overfor bakterier in vitro, var det viktig å bruke bakterier som er enkle å jobbe med i tillegg til at de ses i klinikken hos den aktuelle pasientgruppen. Derfor falt valget på to gramnegative bakterier. *P. aeruginosa* var også interessant dersom vi skulle finne en nedsatt antibiotikafølsomhet, på grunn av dens mange resistensmekanismer. Vi har valgt å undersøke villtype ATCC-stammer istedenfor kliniske isolater, fordi disse ikke tidligere er utsatt for antimikrobielle midler. I et neste forsøk bør man undersøke cytostatikas effekt på grampositive bakterier. Både ATCC-stammer og kliniske isolater bør testes. Det kunne være aktuelt å sette opp et forsøk der man tester bakterier i prøvemateriale fra pasienten før og etter cytostatikabehandling, og deretter sammenlikne dette med prøvemateriale etter endt antibiotikabehandling hos samme pasient.

### Kontroller

Vårt forsøk viser tydelig nytten av å bruke kontroller i alle laboratorieforsøk. Det var ved å kartlegge MIC-verdiene til kontrollstammen under våre betingelser at vi hadde et sammenlikningsgrunnlag for MIC-verdiene etter forsøket. Vi kunne også kun ha stolt på referanseverdiene oppgitt fra produsenten, men da hadde vi ikke oppdaget subkoloniene på kontrollstammen. Dette kunne ledet oss til å tro at subkoloniene vi fant dag 50/36 var et resultat av cytostatikaeksponeringen og ville gitt en feilkonklusjon av forsøket. Vi har eksponert bakteriene parallelt for NaCl 0,9 % for å sikre at eventuelle forandringer på bakterien ikke skyldes de mange generasjonenes vekst på agar. Vi har fryst ned bakteriene (figur 1), i tilfelle det skulle bli nødvendig å gå tilbake og teste bakteriene på nytt.

### Lengde på forsøket

Vi valgte å gjennomføre et forsøk på 50 dager, med 50 eksponeringer av cytostatika. Om man regner med at bakterien formerer seg hver time, tilsvarer dette minst 1000 doblingstider. Det er altså den samme bakterien som er utsatt for cytostatika over lengre tid, og når vi ikke ser endret følsomhet hos bakterien etter 50 dager, har vi ikke holdepunkter for at betydelig lengre eksponering ville gitt andre resultater.

### Bakteriofag

Det ble observert vekst av bakteriofag på agarskålene med *P. aeruginosa*. Den vanligste bakteriofagen kalles lambda, og er spesifikk for *E. coli*. Det ble ikke registrert bakteriofag sammen med *E. coli* i vårt forsøk, og betydningen av den i tilknytning til *P. aeruginosa* er vi usikre på. Bakteriofager nevnes i litteraturen som vektorer av genetisk materiale, og dette er ikke uten betydning når vi har observert en initial følsomhet overfor 5-FU hos *P. aeruginosa*, som senere forsvant. Dersom vi hadde funnet en signifikant redusert følsomhet for antibiotika etter cytostatikaeksponering i dette forsøket, måtte tilstedeværelsen av bakteriofag diskuteres i større grad. Det er her nevnt fordi det ikke kan utelukkes en interaksjon mellom bakterie og bakteriofag.

### Bakteriehemmende effekt av cytostatika

I vårt forsøk med cytostatikaeksponering overfor *P. aeruginosa*, så vi en oppklaring og kolonier rundt cytostatikalappen med 5-FU 50 µg/ml dag 1, 2, 4 og 17 og 5-FU 250 µg/ml dag 3-6. Dette kan bety at 5-FU har hatt en hemmende effekt på bakterien initialt, og at den etterhvert har utviklet en tilpasning med resistens mot 5-FU etter noen dager med cytostatikaeksponering. Det er beskrevet antibakteriell effekt av 5-FU mot gramnegative bakterier, men ikke på *P. aeruginosa*. Vi har gjennomgått loggbok og framgangsmåte for gjennomføringen av forsøket og ikke funnet variabler som kan forklare lavere bakterietetthet disse dagene. Resultatene er ikke entydige da vi ikke ser bakteriehemning dag 3 med 5-FU, og at vi ser det kun dag 17 senere i ordinærforsøket. Funnet taler likevel for at cytostatika har påvirket bakterieveksten. En annen forklaring kunne vært at bakterien har endret morfologisk utseende på agaren av årsaker vi ikke har undersøkt. Etest® av bakteriene etter cytostatikaeksponering, viser at dette fenomenet ikke har hatt noen betydning for bakteriens følsomhet overfor antibiotika. Det går an å gjenta forsøket med *P. aeruginosa* og 5-FU for å se om den bakteriehemmende effekten de første dagene er reproducerbar. Dette har vi ikke gjort her av tidsmessige grunner.

### Funn av subpopulasjoner og delvis resistens hos *P. aeruginosa* (ATCC 27853)

Som et bifunn i dette forsøket har vi funnet holdepunkter for at *P. aeruginosa* levert fra ATCC-banken består av en subpopulasjon som er helt eller delvis resistent mot flere viktige antibiotika. Funnet av subkolonier i inhibisjonssonene til meropenem, cefotaksim og ceftazidim var ikke forventet, og ble oversett i første omgang. Disse subkoloniene fant vi igjen da vi utførte Etest® av bakteriene etter cytostatikaeksponering, og dannet grunnlag for

en hypotese om at cytostatikaeksponeringen hadde selektert for bakterier som var resistente mot noen antibiotika og derfor kunne vokse i deres inhibisjonssoner. Ved nærmere gjennomgang av tidligere registreringer viste det seg at koloniene var tilstede også ved den første Etest® av kontrollstammen. MIC-verdiene er som forventet høyere for bakteriene fra disse koloniene (tabell 15), hvor vi ser at subpopulasjonen fra cefotaksim er helt resistent, mens den fortsatt er følsom for meropenem. Dette kan tenkes å bero på at en subpopulasjon har en stabilt depressoert (stably depressed) fenotype som uttrykker klasse I  $\beta$ -laktamaser. Disse virker spesifikt på cefalosporiner og hemmes ikke av klavulanat som er en  $\beta$ -laktamasehemmer. Karbapenemer som meropenem er derimot stabile overfor disse klasse I  $\beta$ -laktamaser. Bortfall av poriner, økt effluks eller impermeabilitet (46), kan også tenkes å ha bidratt. Det er kjent at *P. aeruginosa* fra kliniske isolater ofte er resistent mot blant annet  $\beta$ -laktam antibiotika, aminoglykosider og karbapenemer (47, 48), men ATCC 27583 skal ifølge referanseverdiene være følsom for disse antibiotika.

### Konklusjon

Vi har i dette forsøket ikke funnet at gjentatt eksponering av cytostatika overfor *E. coli* og *P. aeruginosa* bidrar til signifikant endring i følsomhet overfor antibiotika. I tabell 13 så vi at MIC-verdiene til *E. coli* var sammenliknbare\* mellom kontrollstammen og dag 50/36. Det er derfor ingen holdepunkter for at de valgte cytostatika i serumkonsentrasjoner fører til nedsatt følsomhet for antibiotika hos *E. coli*. I tabell 14 ser vi også sammenliknbare MIC-verdier for *P. aeruginosa* før og etter cytostatikaeksponering med samme antibiotikafølsomhet. Vi har heller ikke klart å vise at cytostatika virker på disse bakterienes utvikling av antibiotikaresistens.

\* Appendix 1: Hva betyr sammenliknbare MIC-verdier?

I litteraturen er det vist størst effekt av cytostatika på grampositive bakterier, og vi forventet derfor ikke at antibiotikafølsomheten hos *E. coli* og *P. aeruginosa* skulle være veldig forandret etter cytostatikaeksponering. Et negativt resultat er allikevel vel så viktig. Resultatene kan tolkes med rimelig sikkerhet for disse to bakteriene fordi vi har brukt et enkelt forsøk med kontrollerte variabler. Forholdene (tid, komplisert økologisk situasjon med flere bakteriearter i samspill mm.) i naturlige økologiske nisjer i normalfloraen hos pasienter er veldig forskjellige fra vår eksperimentelle modell, og resultatene fra vårt in vitro forsøk gir derfor ingen sikre konklusjoner.

Målet i behandlingen av kreftsyke barn og andre pasientgrupper som får mye antimikrobiell terapi er å redusere all bruk til det som er nødvendig. I den kliniske hverdag må man ta stilling til praksis som omhandler antibiotikabruk. Resistensproblemene er økende, og forbruket av antibiotika er uten kontroll i flere deler av verden (49). Det bør gjøres flere studier med samme modell og ulike bakterie-, cytostatika- og antibiotikakombinasjoner, samt undersøkelser på bakterier fra kliniske isolater. Vi håper at vi i framtiden får en fullstendig oversikt over de faktorer som bidrar til resistens mot antibiotika i behandlingen av barn med kreft og nøyttropeni, og at cytostatika ikke er en av disse faktorene.

## **Litteraturliste**

1. Coles N, Gross R: The effect of mitomycin C on the induced synthesis of penicillinase on *Staphylococcus aureus*. *Biochem & Biophys Research Comm* 1965; 20: 366-371
2. Bodet C et al: Antibacterial activities of antineoplastic agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 9: 437-439
3. Metcalfe BS, Hughes WT: Effects of methotrexate on group A  $\alpha$ -hemolytic streptococci and streptococcal infection. *Cancer* 1972; 30: 588-593
4. Renard KW et al: Effects of cancer chemotherapy on the human aerobic oropharyngeal flora. *Infection* 1986; 5: 237-242
5. Goldschmidt MC, Bodey GP: Effect of chemotherapeutic agents upon microorganisms isolated from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 1: 348-353
6. Kinnunen U et al: Effects of anti-neoplastic agents on the recovery of bacteria and yeasts in an automated blood culture system. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 63-67
7. Calame W et al: Antibacterial effect of etoposide in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:1456-1457
8. Nyhlen A et al: Impact of combinations of antineoplastic drugs on intestinal microflora in 9 patients with leukemia. *Scand J Infect Dis* 2002; 34: 17-21
9. Takahata M et al: Enhancement of 5-fluorouracil uptake into the bacterial cell by piperacillin. *J Antibiotics* 1986; 8: 1167-1171
10. Henriksson R, Grankvist K: Interactions between anticancer drugs and other clinically used pharmaceuticals. *Acta Oncologica* 1989; 24: 451-462
11. Manten A et al: Some observations on antagonism between penicillin and antineoplastic antibiotics. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 1967; 14: 250-258
12. Gieringer JH et al: Effect of 5-fluorouracil, mitoxantrone, methotrexate and vincristine on the antibacterial activity of ceftriaxone, ceftazidime, cefotiam, piperacillin, and netilmicin. *Chemotherapy* 1986; 32: 418-424
13. Gatta G et al: Childhood cancer survival in Europe. *Ann Oncol* 2003; 14 (suppl 5): 119-127
14. Protokollene NOPHO-ALL 2000, NOPHO AML 2004, EURO-LB 2002
15. [www.statenslegemiddelverk.no](http://www.statenslegemiddelverk.no)
16. Norsk legemiddelhåndbok 2004



17. O. Dahl et al (eds): Cytostatika. Medikamentell kreftbehandling. Institutt for farmakoterapi, Den norske Kreftforening. Oslo 1999
18. Wiger K et al. Infeksjoner hos immunsupprimerte barn. Tidsskr Nor Lægeforen 2005; 125: 1168-72
19. Sosial- og helsedepartementet: Tiltaksplan, Tiltak for å motvirke antibiotikaresistens 2000-2004. Oslo Sosial- og helsedepartementet.
20. BD Sensi-Disc brukerhefte, Montebello Diagnostics, Oslo
21. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. Symp Ser Soc Appl Microbiol 2002; 31: 55-64
22. Høiby EA et al: Antimikrobielle midler: grunnlag for fornuftig bruk. ISBN 82-91929-01-7, Det Norske Radiumhospital, Oslo 1997
23. Norsk legemiddelhåndbok 2004
24. Brock et al, red: Biology of microorganisms. Prentice Hall International Editions. ISBN: 0-13-176660-0. Englewood Cliffs, New Jersey 1994
25. E-test Application Sheet, Gram-negative aerobes, EAS004, AB Biodisk 2005-05
26. Pier GB, Ramphal R. Pseudomonas aeruginosa. i: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, red. Principles and practice of Infectious Diseases. ISBN: 0443066434. Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania. 6. utgave 2005, s. 2587-2615
27. NORM/ NORM-VET 2004: Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. Tromsø/ Oslo 2005. ISSN: 1502-2307
28. Mandell D et al: Principles and practice of Infectious Diseases. ISBN: 0443066434. Elsevier Inc., Philadelphia, Pennsylvania. 6. utgave 2005
29. Høiby EA et al: Antimikrobielle midler: grunnlag for fornuftig bruk. ISBN 82-91929-01-7, Det Norske Radiumhospital, Oslo 1997, s.28
30. Høiby N, red, et al: Basal og klinisk mikrobiologi. FADLs forlag. Århus 1998.
31. Cytostatika: Håndtering og administrasjon. Fresenius Kabi. 3. utgave 1998.
32. Statens legemiddelverk, Preparatomtaler (SPC): [www.legemiddelverket.no](http://www.legemiddelverket.no)
33. Felleskatalogen 2005; Metotreksat, Vinkristin, 5-fluorouracil, Cytarabin, Doksorubicin.
34. Etest® for MIC determination; Etest® technical guide 3B, Abbiodisk , Dalvagen 10, Solna, Sweden
35. Natås O et al.: Kvalitetskontroll av resistensbestemmelse av aerobe hurtigvoksende bakterier med agardiffusjon. Oslo, Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål, juni 2006

36. N. Høiby: Basal og Klinisk Mikrobiologi. ISBN 87-7749-176-9, FADLs forlag, Århus 1998, s. 24
37. Om Mueller-Hinton: [www.quelab.com/htmleng/1247a.html](http://www.quelab.com/htmleng/1247a.html)
38. V Lorian: In vitro simulation of in vivo conditions: physical state of the culture medium. J Clin Microbiol 1989; 11: 2403-2406
39. Pruzanski W, Saito S: Influence of chemotherapeutic agents on the antibacterial activity of normal and leukemic sera. J Nat Cancer Inst 1974; 52: 643-647
40. Hopfer R et al: Routine use of BACTEC 16B bottles to remove antibacterial and antitumor agents from blood cultures of cancer patients. J Clin Microbiol 1983; 18: 759-764
41. Borsi JD et al: A comparative study on the pharmacokinetics of methotrexate in a dose range of 0.5g to 33.6g/m<sup>2</sup> in children with acute lymphoblastic leukaemia. Cancer 1987; 60: 5-13
42. Goldschmidt MC, Bodey GP: Effect of chemotherapeutic agents upon microorganisms isolated from cancer patients. Antimicrob Agents Chemother 1972; Apr: 348-353
43. Terret C et al: Dose and time dependencies of 5-fluorouracil pharmacokinetics. Clin Pharmacol & Therapeutics 2000; 68: 270-279
44. Frost BM et al: Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2004; 104: 8: 2452-2457
45. Arbeidsgruppen for antibiotikaspørsmål (Natås O et al): Kvalitetskontroll av resistensbestemmelse av aerobe hurtigvoksende bakterier med agardiffusjon. 2.juni 2006, s. 5
46. Livermore DM: Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa; our worst nightmare? Clin. Inf. Dis. 2002; 34: 643-650
47. Fluit AC, Verhef J, Schmitz FJ: Antimicrobial resistance in European isolates of Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Inf Dis 2000; 19: 370-374
48. Walsh TR et al: Metallo-β-Lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2006; 18: 306-325
49. Goosens H et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database. Lancet 2005; 365: 579-587.
50. Elkins CA, Beenken KE: Modeling the tripartite drug efflux pump archetype: Structural and functional studies of the macromolecular constituents reveal more than their names imply. J Chemother 2005; 17: 6: 581-592

51. Nyhlen A: Antibiotics in patients on chemotherapy- aspects on pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions with antineoplastic drugs. PhD 2002, Medical Faculty of Lund University, Sweden. Not published.

## **Appendix 1:**

### **Hva betyr sammenliknbare MIC-verdier?**

I tabell 12-14 er MIC-verdier for ulike de antibiotika presentert. I diskusjonen ovenfor konkluderer vi med at antibiotikafølsomheten før og etter cytostatikaeksponering i hovedsak er den samme. Men dersom man ser nærmere på tallene i tabell 12-14, ser vi at MIC-verdiene ikke er nøyaktig de samme og at referanseverdiene er oppgitt i intervaller. MIC-verdiene til to bakterier testet for samme antibiotikum trenger ikke være identiske selv om de klassifiseres som like følsomme i S, I, R - systemet. Verdiene i MIC-systemet er basert på en logaritmisk skala (to-folds fortynning). På grunn av en naturlig variasjon i et biologisk system som MIC-bestemmelse av ett bestemt bakterieisolat overfor ett bestemt antibiotikum, vil man få en variasjon om man repeterer testen blindt i mange oppsett. Mesteparten av resultatene vil gi en bestemt MIC-verdi, men et mindre antall forsøk vil gi naboverdier over eller under. Dette er grunnen til at man vil kreve minst fire eller åtte ( $2^2$  eller  $2^3$ ) ganger så høy MIC-verdi for at det skal ha skjedd en signifikant endring i antibiotikafølsomhet. Referanseverdiene fra AB Biodisk er gitt i intervaller som strekker seg over  $2^2$  verdier. Eksempel: 0-P-Ktr bakterien med MIC-verdi 0.38 µg/ml for meropenem (MP), klassifiseres som like følsom som 50-P-MTX bakterien med MIC-verdi 0.5 µg/ml for MP. Det er et vurderingsspørsmål om man skal klassifisere bakteriene med MIC-verdier 0,75 og 1,0 µg/ml som like følsomme i dette forsøket, men de er alle innen referanseområdet for ATCC-stammen (altså innenfor to to-folds fortynninger av antibiotikumet).

**Takk til:**

Jeg vil takke alle som har vært involvert i prosjektet, for all støtte og lærdom til en medisinstudent som skulle lære seg å krabbe og gå i forskningens verden. Takk til Karianne Wiger for hjelp med idé og utforming av prosjektet, samt entusiasme og motivasjon hele veien til mål. Takk til Karianne og May-Liss Knudsen for hjelp med å lese av bakterieskåler under forsøket, og hyggelige samtaler på laboratoriet. Takk til Arne Høiby for fotografering, faglige og kulturelle innspill og språklig tilbakemelding. Takk til Petter Brandtzæg for veiledning og tilbakemelding fra sin kliniske erfaring.